

Patologi dan Teknis Pengujian Kesehatan Benih Tanaman Aneka Kacang

Pathology and The Seed Health Testing Techniques of Legumes

Mudji Rahayu

Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Malang

email: muji_sings@yahoo.com

NASKAH DITERIMA: 5 MEI 2016; DISETUJUI UNTUK DITERBITKAN: 2 SEPTEMBER 2016

ABSTRAK

Patologi benih merupakan salah satu bidang ilmu dari penyakit tanaman (fitopatologi), didefinisikan sebagai studi tentang penyakit pada benih untuk mengetahui faktor penyebab penyimpangan fungsi benih. Bidang ilmu ini juga mempelajari hubungan antara patogen dan inangnya yaitu peran biji sebagai sumber penyebaran dan penularan penyakit, serta tindakan yang perlu diambil untuk mengendalikan kerusakan yang diakibatkannya. Diperlukan dukungan pengetahuan lain di antaranya fitopatologi umum, mikrobiologi, dan teknologi benih dalam mempelajari patologi benih. Benih sehat memiliki arti bahwa biji yang digunakan sebagai benih harus bebas dari infeksi ataupun kontaminasi patogen. Patogen yang menginfeksi benih aneka kacang terdiri atas beberapa jenis jamur, bakteri, dan virus. Berbeda dengan penyakit pada bagian vegetatif tanaman seperti daun dan batang, penyakit benih seringkali tanpa gejala kerusakan sehingga sulit diketahui secara visual. Benih membawa penyakit biasanya dideteksi dengan metode standar dari ISTA (*Seed International Seed Testing Association*), suatu lembaga resmi di dunia yang menetapkan standar mutu benih termasuk pengujian kesehatan benih. Metode pengujian yang umum dilakukan adalah secara konvensional (pemeriksaan secara visual atau cara kering, cara basah dengan perendaman atau ekstraksi benih, dan inkubasi pada media buatan), deteksi secara serologi dan molekuler, serta metode pertumbuhan benih di rumah kaca. Uji kesehatan benih berperan penting dalam perbaikan mutu benih (*seed improvement*), perdagangan benih (*seed trade*), dan perlindungan tanaman (*plant protection*). Pelaksana pengujian dapat dilakukan oleh penangkar namun sebaiknya dilakukan oleh laboratorium terakreditasi yang dikelola secara profesional. Dalam memproduksi benih sehat pada tanaman aneka kacang, perlu upaya pengendalian penyakit pada tanaman di lapangan yang dilakukan sejak periode tanaman mulai tumbuh hingga panen (prapanen) dan pengendalian di tempat penyimpanan atau selama distribusi benih (pascapanen).

Kata kunci: aneka kacang, patogen benih, uji kesehatan benih, pengelolaan penyakit

ABSTRACT

Pathology and the seed health testing techniques of legumes. Seed pathology is a science of

plant diseases (phytopathology), defined as study of the abnormal function of seed due to seedborne pathogens. This science is also studying the relationship between pathogen and the host plant, role of seed as the source of diseases, spread of disease, and the control measures. Other knowledge is need to support this science including microbiology, and seed technology. Healthy seed meaning is the seed must be free from pathogens infection or contamination. Seedborne disease on legumes is due to pathogens including fungi, bacteria, and viruses. Compared with diseases in vegetative parts of plant such as leaves and stems, infected seed often asymptomatic, making visual detection imposible. Infected seed can be detected using the ISTA methods. ISTA (International Seed Testing Association) is an institution in the world has been developed the seed health testing methods including conventional detection (dry seed observation or dry method, wet method by immersion or extraction of seeds, and incubation using artificial media), serological and molecular detections, and seed growth test under greenhouse condition. Seed health testing is an important way in improving the quality of seed (seed improvement), the seed trade, and the crops protection againsts diseases. Of course the methods should be conducted in an accredited laboratory which professionally managed. In order to produce the healthy seed in legumes, several disease control measures to be done in field since the first growth of plant until seed harvesting (pre-harvest), also during seed storage or distribution (post-harvest).

Keywords: legumes, seed pathogens, seed health testing, disease management.

PENDAHULUAN

Patologi benih merupakan salah satu bidang ilmu penyakit tanaman (fitopatologi), didefinisikan sebagai studi tentang penyakit benih untuk mengetahui faktor penyebab penyimpangan fungsi benih. Bidang ilmu ini juga mempelajari hubungan antara patogen dan inangnya yaitu peran benih sebagai sumber penyebaran dan penularan penyakit, serta tindakan yang perlu diambil untuk mengendalikan kerusakan yang diakibatkannya. Paul Neergaard adalah bapak patologi benih yang bersama dengan Mary Noble mencetuskan istilah patologi benih di tahun 1940-an (Agarwal dan

Sinclair 1997). Dalam mempelajari patologi benih diperlukan dukungan beberapa pengetahuan lain di antaranya adalah fitopatologi umum, mikrobiologi, dan teknologi benih.

Benih tanaman harus memiliki kemampuan hidup yang tinggi (viabilitas) sebagai calon penerus generasi dalam produksi tanaman. Sebagian besar (90%) tanaman pangan untuk alat pembiakannya berupa biji atau benih. Dengan demikian benih harus memiliki mutu tinggi. Petani tanaman pangan termasuk aneka kacang seringkali mengalami kerugian yang tidak sedikit baik dari segi biaya maupun waktu, akibat penggunaan benih bermutu rendah. Pencapaian produksi tanaman aneka kacang sangat tergantung pada teknologi maju dalam budidaya dan kondisi iklim atau cuaca yang mendukung, tetapi penting untuk memperhatikan pemilihan benih bermutu tinggi. Menurut Sutopo (2004) bahwa mutu benih dapat dilihat dari tiga komponen yaitu mutu genetis terkait kemurnian varietas, mutu fisiologis yaitu memiliki daya kecambah dan vigor yang baik, serta mutu fisik seperti bernaas, ukuran homogen, tidak tercampur material lain, dan sehat atau bebas dari hama dan penyakit. Dalam proses produksi benih bermutu, maka sejak awal bercocok tanam harus digunakan bahan bermutu tinggi, dengan kriteria sebagai berikut : 1. Benih harus bersih dan bebas dari segala jenis kotoran yang tercampur dalam lot benih, 2. Murni terdiri satu jenis varietas, tidak tercampur dengan varietas lainnya, 3. Secara fisik bagus, bernaas, warna tidak kusam, kulit tidak terkelupas, mulus tidak ada bercak, tidak keriput, dan 4. Sehat tidak membawa hama penyakit yang merugikan.

Fokus pada kriteria keempat, benih sehat memiliki arti bahwa benih harus bebas dari infeksi ataupun kontaminasi penyakit. Kesehatan benih sangat menentukan kesehatan tanaman supaya memberikan produksi yang berkualitas (Diaz *et al.* 1998). Benih aneka kacang adalah biji yang mengandung nutrisi tinggi. Biji sejak awal terbentuk pada tanaman induk, sampai periode panen kemudian digunakan sebagai benih yang tumbuh menjadi tanaman baru tidak lepas dari gangguan patogen. Semua jenis patogen (jamur, bakteri, dan virus) dapat menyerang benih dan menggunakan nutrisi yang ada dalam benih untuk hidupnya, hal ini menyebabkan kerusakan pada benih. Pada umumnya benih setelah dipanen, tidak selalu langsung ditanam oleh petani tetapi sebagian akan disimpan selama jangka waktu tertentu menunggu musim tanam yang tepat dan pada periode tersebut dapat terjadi kerusakan akibat penyakit terbawa benih. Untuk itu diperlukan penanganan benih secara baik agar pada saat ditanam kondisi benih masih memadai yaitu memiliki viabilitas, kevigoran, kemurnian dan kese-

hatan yang baik. Status kesehatan benih dapat diketahui melalui pengujian khusus untuk mendeteksi adanya patogen yang mungkin terbawa dalam suatu lot benih. Uji kesehatan benih bukan merupakan ramalan, tetapi suatu metode untuk mendapatkan informasi tentang kemungkinan adanya suatu resiko penyakit menular melalui benih. Tujuan dari penulisan ini adalah untuk mengenal penyakit-penyakit penting pada benih tanaman aneka kacang, teknis pengujian kesehatan benih sesuai metode standar, dan pengelolaan penyakit benih.

PENYAKIT PENTING PADA BENIH ANEKA KACANG

Penyakit terbawa benih memiliki arti penting karena merugikan secara kualitas dan kuantitas terhadap produksi tanaman ataupun industri makanan berbahan baku biji. Gejala penyakit benih nampak secara visual ketika benih dikecambahkan, umumnya berupa busuk biji (*seed rot*), rebah bibit (*damping-off*) atau tanaman mati, dan menyebabkan turunnya populasi tanaman di lapangan (Malvick 2002). Kerugian akibat penyakit benih dapat muncul dalam waktu yang pendek atau langsung dan dalam waktu yang lambat atau dampak jangka panjang. Kerugian jangka pendek adalah turunnya daya kecambah, vigor yang lemah, bibit atau tanaman muda abnormal bahkan mati, dan kerusakan lainnya pada setiap tahap pertumbuhan tanaman hingga panen dan pascapanen. Kerugian jangka panjang muncul ketika benih didistribusi ke areal luas, maka benih tidak sehat menjadi sumber infeksi baru, terutama di areal yang belum pernah terjangkit penyakit. Menurut Singh *et al.* (2011) penyakit terbawa benih menjadi penting karena dua hal yaitu: (1) mengganggu perkecambahan, pertumbuhan dan produktivitas tanaman, dan (2) menyebabkan penyakit lewat biji dan bibit (*seed and seedlings disease*) melalui infeksi yang berkembang sistemik atau lokal. Kakde dan Chavan (2011) menyatakan bahwa penyakit benih menyebabkan berubahnya komposisi kimia seperti berkurangnya kandungan karbohidrat, protein, lemak dalam biji. Berikutnya dinyatakan oleh Barros *et al.* (2011) bahwa kontaminasi jamur menghasilkan senyawa mikotoksin dalam biji tanaman pangan, sangat membahayakan kesehatan manusia dan ternak.

Jamur merupakan jenis patogen dominan yang menginfeksi benih tanaman aneka kacang (Tabel 1). Gejala penyakit benih pada umumnya nampak secara visual ketika benih dikecambahkan, dan gejalanya beragam seperti busuk biji (*seed rot*), rebah bibit (*damping-off*) dan tanaman mati, sehingga terjadi pengurangan populasi tanaman (Malvick 2002).

Tabel 1. Patogen tular benih yang penting pada tanaman aneka kacang

Tanaman inang	Jenis patogen (jamur, bakteri, dan virus)
Kedelai	<p>Jamur: <i>Macrophomina phaseolina</i>, <i>Fusarium oxysporum</i>, <i>Aspergillus flavus</i>, <i>A. niger</i>, <i>Phoma</i> sp. dan <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>, <i>Cercospora kikuchii</i>, <i>Peronospora manshurica</i>, <i>Microsphaera diffusa</i>, <i>Alternaria</i> spp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Verticillium</i> spp., <i>Pythium</i> sp., <i>Phytophthora</i> sp., <i>Curvularia lunata</i>, <i>Penicillium</i> spp.</p> <p>Bakteri: <i>Pseudomonas syringae</i>, <i>Xanthomonas axonopodis</i>.</p> <p>Virus: Soybean Mosaic Virus (SMV), Soybean Stunt Virus (SSV).</p>
Kacang tanah	<p>Jamur: <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Botrytis cinerea</i>, <i>Mucor</i> spp., <i>Curvularia</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Botryodiplodia theobromae</i>, <i>Aspergillus flavus</i>, <i>A. niger</i>, <i>S. rolfsii</i>, <i>S. bataticola</i>, <i>R. solani</i>, <i>Verticillium</i> sp., <i>Mucor</i> sp., <i>Rhizopus</i>.</p> <p>Bakteri: <i>Ralstonia solanacearum</i>.</p> <p>Virus: Peanut Mottle Virus (PMoV).</p>
Kacang hijau	<p>Jamur: <i>Alternaria</i> sp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Myrothecium roridum</i>, <i>Drechslera</i> sp., <i>Aspergillus flavus</i>, <i>A. niger</i>, <i>Macrophomina phaseolina</i></p>

Sumber: dirangkum dari berbagai sumber.

Pada kedelai, jamur terbawa benih yang penting di antaranya adalah *Alternaria* spp., *Cercospora kikuchii*, *Cladosporium* spp., *Phomopsis*, *Fusarium* spp. dan *Verticillium* spp. (Villarreal *et al.* 2004); *Phytophthora* sp. (Malvick 2002); *Peronospora manshurica* dan *Microsphaera diffusa* masing-masing menyebabkan penyakit embun bulu atau *downy mildew* dan embun tepung atau *powdery mildew* (Sweets *et al.* 2008); serta *Phoma* sp. penyebab busuk biji yang menjadi kendala serius pada produksi benih kedelai di Amerika (Jackson *et al.* 2005; Pathan *et al.* 2009). Berikutnya Ramesh *et al.* (2013) mengidentifikasi 11 jamur pada benih kedelai yang terpenting adalah *Macrophomina phaseolina*, *F. oxysporum*, *A. flavus*, *A. niger*, *Phoma* sp. dan *Sclerotinia sclerotiorum*; dan yang kurang penting *F. solani*, *F. moniliformae*, *Rhizopus* sp., *Botrytis cinerea* dan *Cercospora kikuchi*. Bakteri terbawa benih kedelai yang penting adalah *Pseudomonas syringae* (disebut juga *P. savastanoi*) penyebab hawar daun, dan *Xanthomonas axonopodis* penyebab pustul (Giesler 2011; Dutta *et al.* 2014). Virus pada benih kedelai yang merugikan adalah virus mosaik SMV atau Soybean Mosaic Virus dan virus kerdil SSV atau Soybean Stunt Virus (Saleh 2007). Infeksi kedelai SMV pada fase vegetatif tanaman umur 10 hari, menurunkan hasil biji 29–41%. Penurunan hasil lebih rendah bila infeksi terjadi pada umur lebih tua (50 hari) seberat 2,5–4,5%. Penularan SMV melalui benih mencapai 8% (Rahayu 1989; Sunartiningih 1991). Andayanie (2012) menyatakan bahwa virus SMV terdeteksi pada benih kedelai yang ditanam di Ngawi dan Madiun (Jawa Timur).

Pada kacang tanah, jamur penyebab kerusakan polong seperti *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis cinerea*, *Mucor*

spp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., dan *Botryodiplodia theobromae* dapat terbawa pada benih (Dharmaputra dan Retnowati 1996; Elwakil dan El-Metwally 2001), demikian juga *Sclerotium rolfsii* (Mehan *et al.* 1995). *Aspergillus flavus*, pada kacang tanah menurunkan kandungan karbohidrat dan lemak biji (Naikoo *et al.* 2013); serta merusak protein biji (Singare dan Ade 2014). Begum *et al.* (2013) menyatakan bahwa benih kacang tanah yang disimpan 6 bulan, terjadi serangan *A. flavus* 0,25% sangat rendah persentase infeksi ini tetapi merupakan batas yang dapat ditoleransi karena berindikasi menurunkan perkecambahan menjadi 71%. Bakteri *R. solanacearum* penyebab kerusakan pembuluh batang sehingga timbul gejala layu pada kacang tanah, menular melalui benih dengan persentase 5–8% (Zeng *et al.* 1994). Virus PMoV atau Peanut Mottle Virus menyebabkan penyakit belang pada daun kacang tanah, menular melalui benih dengan persentase 0,9–3,7% (Saleh dan Baliadi 2015).

Pada kacang hijau, jamur merupakan patogen utama penyebab kerusakan benih. Beberapa jamur seperti *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *Myrothecium roridum*, *Drechslera* sp., *Aspergillus flavus*, dan *A. niger* merupakan kompleks patogen penyebab penyakit busuk kecambah atau *seedling rot* yang sangat merugikan karena menurunkan populasi tanaman sehat (Bakr dan Rahman, 2001). Pada Tabel 1 diuraikan secara ringkas jenis patogen penting pada tanaman aneka kacang.

Patogen terbawa pada benih, menempati posisi yang berbeda seperti: (1) tercampur dengan benih dan patogen tersebar hidup di antara individu benih hal ini biasanya terjadi selama pengelolaan benih di lapangan, propagul sklerosis dan spora jamur dapat tercampur dengan cara ini; (2) patogen menempel di permukaan biji (eksternal), terjadi pada sel bakteri

dan jamur; dan (3) patogen menginfeksi masuk ke dalam biji (internal) hidup menetap dalam biji misalnya pada virus dan bakteri. Masa aktif jamur penyebab penyakit benih terjadi saat benih tumbuh dalam tanah, terutama di lingkungan yang cukup lembab dengan suhu hangat. Jamur *Phytophthora* yang terbawa benih kedelai, akan aktif berkembang di tanah yang lembab dengan suhu tanah hangat 28–44 °C (McMahon 2011). Kesehatan yang buruk pada tanaman induk akibat dari belum optimalnya upaya pengendalian di lapangan, merupakan faktor pemicu berkembangnya penyakit pada benih. Selain itu kerusakan mekanis pada benih yang timbul selama proses pemanenan, pengelolaan dan penyimpanan benih; serta kadar air benih yang tinggi akibat proses pengeringan yang kurang baik, merupakan faktor kondusif yang memicu serangan berbagai patogen pada benih. Benih membawa penyakit berakibat pada rendahnya daya kecambah dan lemahnya vigor benih, mengurangi populasi tanaman sehat sehingga merugikan secara ekonomis karena menambah kebutuhan benih untuk tanam ulang.

TEKNIS PENGUJIAN KESEHATAN BENIH

Benih sakit atau dalam kondisi terinfeksi patogen pada umumnya tidak menampilkan gejala kelainan visual, berbeda dengan penyakit pada jaringan vegetatif tanaman seperti batang, akar, dan daun yang gejalanya khas. Penyakit terbawa benih hanya dapat dideteksi melalui pengujian kesehatan benih. Pada pengujian kesehatan benih sekaligus akan teruji vigor atau mutu fisiologis benih, apakah mutu yang rendah dipengaruhi oleh faktor prapanen seperti biji belum cukup umur panen, adanya penyakit, atau karena kerusakan mekanis pada periode panen hingga proses pengelolaan benih. *International Seed Testing Association* (ISTA 2006) suatu lembaga dunia, secara resmi menetapkan standar mutu benih beserta metode pengujian kesehatan benih, menyebutkan bahwa pengujian kesehatan benih mempunyai beberapa alasan sebagai berikut:

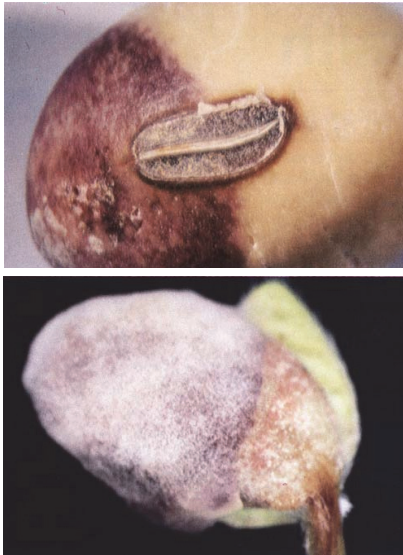
1. Inokulum patogen yang terbawa benih berpeluang berkembang menjadi penyakit merugikan di lapangan sehingga menurunkan nilai komersial benih.
2. Benih dari daerah lain dapat menjadi perantara penyebaran penyakit di daerah baru. Karantina dan sertifikasi kesehatan benih sangat berguna untuk mencegah penyebaran penyakit, skala nasional maupun internasional.
3. Pengujian kesehatan benih bertujuan untuk menjelaskan faktor penyebab rendahnya daya kecambah di lapangan, sehingga akan menjadi pelengkap dalam proses uji daya kecambah.

4. Hasil pengujian kesehatan benih dapat menunjukkan perlu tidaknya perlakuan atau *treatment* dalam suatu lot benih, terkait dengan upaya pengendalian penyakit atau mengurangi risiko penyebaran penyakit.

Pada uji kesehatan benih, tidak semua patogen atau penyakit akan dideteksi. Pengujian biasanya dilakukan secara selektif, hanya untuk penyakit yang diduga penting yang perlu diperiksa. Metode deteksi sederhana secara visual yang mudah dilakukan adalah melalui pemeriksaan kerusakan warna dan bentuk kulit ari pada benih, namun terbatas pada penyakit tertentu misalnya bercak coklat pada benih kedelai merupakan tanda infeksi virus SMV. Sedangkan penyakit tanpa kelainan khas pada benih hanya dapat diketahui melalui pengujian kesehatan dengan metode khusus sesuai dengan jenis patogen yang dideteksi.

Dalam prosedur pengujian kesehatan benih, tahap awal yang perlu dipersiapkan adalah penyiapan contoh benih yang dapat dianggap seragam dan memenuhi persyaratan yang telah ditentukan sesuai aturan dari ISTA. Suatu benih yang diuji harus dapat mewakili keseluruhan kelompok benih yang lebih besar jumlahnya. Macam contoh benih menurut peraturan ISTA (2006) adalah: (1) contoh primer (*primary sample*) adalah contoh yang diambil dalam jumlah besar dari berbagai tempat penyimpanan baik wadah maupun *bulk*, (2) contoh campuran (*composite sample*) adalah semua primer yang dijadikan satu dan dicampur dalam satu tempat (kantong, kotak, nampan dan lain-lain) dan biasanya contoh campuran jauh lebih besar dari yang diperlukan sehingga harus dikurangi, (3) contoh yang dikirim ke laboratorium (*submitted sample*) adalah contoh campuran yang telah dikurangi sampai jumlah dan berat tertentu yang telah ditetapkan dan kemudian dikirim ke laboratorium penguji, (4) contoh uji (*working sample*) adalah contoh benih yang diambil dari *submitted sample* dan digunakan sebagai bahan uji kesehatan di laboratorium. Penyiapan contoh benih hingga waktu pengujian kesehatan, rentang waktunya harus dirancang sedemikian rupa sehingga memungkinkan patogen masih tumbuh dan mudah dideteksi keberadaannya pada contoh benih tersebut.

Metode pengujian kesehatan benih yang berkembang saat ini terdiri beberapa macam dan setiap metode memiliki kepekaan berbeda sesuai jenis patogen sasaran, jenis benih, dan maksud dari pengujian. Setiap metode pengujian perlu peralatan dan tenaga penguji atau pengamat berpengalaman yang terlatih dan didukung dengan ilmu pengetahuan tentang patologi benih yang memadai. Latihan dapat diperoleh melalui pengujian berulang-ulang dengan metode yang berbeda, dengan hasil evaluasi hasil



Gambar 1. Bercak ungu pada biji kedelai dan keping kecambah yang terserang jamur *C. kikuchii*. Sumber: McGee dan Nyvall 2008.

yang tepat. Metode pengujian yang lazim dilakukan dalam deteksi patogen benih adalah pemeriksaan secara kering, cara basah melalui perendaman, dan cara inkubasi melalui pemeraman pada media tertentu (metode konvensional yang relatif sederhana dan tidak mahal). Masing-masing cara deteksi tersebut memiliki tujuan khusus seperti diuraikan sebagai berikut.

1. Pemeriksaan cara kering

Dengan metode ini sejumlah benih diperiksa secara kering, pada umumnya untuk mengetahui secara visual adanya badan buah jamur, miselia, spora, sklerotia, gall, insekta dan lain-lain yang tercampur dalam lot benih. Pemeriksaan cara kering sesuai untuk melihat kerusakan warna pada kulit biji, dan kerusakan mekanis seperti biji keriput atau abnormal, dan biji busuk. Pemeriksaan dapat dilakukan secara visual dengan mengamati langsung pada contoh benih ataupun dengan bantuan mikroskop stereo. Kelainan warna pada kulit biji kedelai berupa bercak ungu (Gambar 1) merupakan tanda bahwa benih dihasilkan oleh tanaman terserang jamur *C. kikuchii* penyebab penyakit bercak daun *Cercospora blight* (Mengistu *et al.* 2012).

Demikian juga virus SMV pada kedelai, dapat diperiksa secara visual adanya kelainan warna kulit biji berupa bercak berwarna kecoklatan hingga kehitaman yang menyelaputi kulit ari biji (Gambar 2). Biji belang tersebut sebagai indikasi bahwa di lapangan tanaman induk terinfeksi SMV. Pemeriksaan secara visual perlu diikuti dengan metode pemeriksaan yang lain seperti diuraikan di bawah ini.



Gambar 2. Kelainan warna kulit biji kedelai berupa bercak coklat yang diakibatkan oleh virus SMV atau soybean mosaic virus. Sumber: koleksi pribadi.

2. Pemeriksaan secara perendaman

Pada metode ini dilakukan ekstraksi patogen yang melekat atau hidup di permukaan benih. Sejumlah contoh benih dimasukkan dalam air steril kemudian digojok selama waktu tertentu, dan air cucian tersebut selanjutnya diperiksa langsung di bawah mikroskop untuk pengamatan spora dan hifa jamur. Untuk pemeriksaan bakteri terbawa benih, ekstraksi dilakukan dengan perendaman benih dalam air steril, penggojokan dan penghancuran benih. Bakteri dalam ekstrak benih selanjutnya diisolasi dan diidentifikasi dengan cara ditumbuhkan pada beberapa jenis media agar-agar yang mengandung senyawa tertentu untuk mengetahui identitas bakteri berdasarkan karakter fisiologi dan biokimia bakteri (Balai Besar PPMBTPH 2007).

3. Pemeriksaan secara inkubasi

Pada metode inkubasi atau pemeraman, contoh benih diperam pada beberapa jenis media sebagai berikut.

a. Media kertas blotter

Inkubasi benih pada kertas *blotter* adalah pengujian kesehatan benih melalui perkecambahan biji yang sekaligus untuk mendeteksi patogen terbawa benih, patogen yang terdeteksi biasanya dari jenis jamur. Benih yang diuji dikecambahkan pada cawan Petri berisi kertas saring, keduanya dalam kondisi steril. Untuk mencegah adanya jamur kontaminan yang bukan sasaran pengujian, benih perlu disterilkan dahulu dengan merendam benih dalam larutan desinfektan natrium hipoklorit 1,0% selama 30 detik, diikuti pembilasan 3 kali dengan air suling steril. Cawan berisi benih selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu dingin (22) °C selama 7–10 hari, dengan pencahayaan lampu NUV (Near Ultra Violet) dengan periode gelap dan terang selama 12 jam terang dan 12 jam gelap untuk memicu pertumbuhan jamur.

Setiap jamur yang muncul bersamaan dengan benih yang berkecambah selanjutnya diperiksa dengan mikroskop. Metode uji pada kertas *blotter* adalah suatu metode uji yang praktis dan sederhana, tetapi kurang sesuai untuk deteksi bakteri dan virus. Menurut Mc

Tabel 2. Jamur patogenik pada benih kedelai yang terdeteksi melalui metode kertas blotter.

Jamur patogen	Kerusakan dan arti penting penyakit
<i>Phomopsis</i>	Penyakit busuk batang dan polong. Intensitas penyakit lebih dari 20% dapat merusak viabilitas
<i>Cercospora</i>	Penyakit noda ungu pada biji dan biji keriput. Penyakit tidak mempengaruhi viabilitas
<i>Fusarium</i>	Menurunkan viabilitas
<i>Bacillus</i> spp.	Bakteri penyebab busuk biji dan merusak viabilitas
<i>Aspergillus</i>	Penyakit pada biji di tempat penyimpanan yang kondisinya lembab, merusak viabilitas
<i>Alternaria</i>	Belum diketahui pengaruhnya
<i>Cladosporium</i>	Belum diketahui pengaruhnya

Sumber: McGee dan Nyval 2008.

Gee dan Nyval (2008) dengan metode kertas *blotter* dapat dideteksi terutama jenis jamur (Tabel 2). Rao *et al.* (2015) menggunakan kertas *blotter* dan media agar-agar pada uji kesehatan benih kedelai, hasilnya pada kertas *blotter* terdeteksi lebih banyak jamur dengan persentase koloni 35,7–40,9% sedangkan pada media agar-agar persentasenya lebih rendah berkisar 20,7–26,4%.

b. Media agar-agar

Metode inkubasi patogen pada media agar-agar memerlukan waktu yang relatif lama. Media agar-agar mengandung nutrisi seperti karbohidrat, protein, lemak, mineral dan vitamin yang sesuai untuk pertumbuhan patogen. Untuk menumbuhkan jamur biasanya mengandung nutrisi tertentu seperti pada *Maltose Extract Agar* (MEA), dan *Potato Dextrose Agar* (PDA). Jamur yang diisolasi dari benih yang tumbuh pada media agar-agar perlu diidentifikasi lebih lanjut secara mikroskopis untuk mengetahui karakter morfologinya. Untuk pemeriksaan bakteri terbawa benih, isolate bakteri yang didapatkan dari hasil ekstraksi benih selanjutnya diisolasi pada media agar-agar tertentu untuk diidentifikasi berdasarkan karakter fisiologi dan biokimia bakteri (Balai Besar PPMBTPH 2007). Bakteri *Xanthomonas campestris* biasanya ditumbuhkan pada media selektif yang mengandung antibiotik, fungisida, dan senyawa inhibitor (Touissaint *et al.* 2001). Wydra *et al.* (2004) mengembangkan media semi selektif yaitu CCM (*Cefazolin Celobiose Metionin*) untuk isolasi dan deteksi bakteri benih kedelai seperti *Xanthomonas axonopodis*.

c. Penumbuhan benih (*growing on test*)

Pengujian ini merupakan metode konvensional yang didasarkan pada pertumbuhan tanaman setelah melewati masa kecambahnya dan memperlihatkan gejala penyakit. Cara ini biasanya untuk deteksi penyakit yang waktu inkubasinya lama sehingga sulit dideteksi dengan metode inkubasi pada kertas *blotter* dan media agar-agar, contohnya adalah penyakit virus SMV pada kedelai (Rahayu 1989; Sunartiningih

1991). Media untuk penumbuhan benih pada umumnya berupa pecahan batu bata, pasir, tanah, kompos, dan vermikulit yang kondisinya steril untuk menghindari kontaminan patogen lain terbawa dalam media. Penyakit virus dapat diketahui secara visual gejalanya terutama pada tanaman muda (*seedlings*), dan untuk mendapatkan hasil deteksi yang tepat perlu analisis lebih lanjut melalui ekstraksi tanaman sakit dan uji penularan ekstrak secara mekanis pada tanaman indikator yang sehat dari jenis varietas rentan virus. Tanaman indikator setelah diinokulasi ekstrak virus akan menampilkan gejala infeksi lokal atau sistemik, misalnya pada virus mosaik SMV yang terbawa pada kedelai dan virus belang PMoV yang terbawa pada benih kacang tanah (Saleh 2007).

4. Pemeriksaan dengan metode serologi dan molekuler

Berbagai teknik serologi telah digunakan dalam deteksi dan diagnosis patogen terbawa benih. ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) merupakan salah satu metode serologi yang efisien dan murah terutama untuk mendeteksi penyakit virus dan bakteri terbawa benih. Teknik serologi sering digunakan untuk mendeteksi patogen yang menginfeksi secara laten dalam waktu yang cepat. Pengujian secara serologi tidak memerlukan isolasi patogen, tetapi diperlukan antibodi spesifik.

Deteksi penyakit benih dengan metode molekuler menggunakan marka DNA melalui reaksi polimerase berantai (*Polymerase Chain Reaction* atau PCR) merupakan cara pengujian kesehatan benih yang sangat teliti dan sering digunakan dalam proses sertifikasi benih dan karantina tanaman. Deteksi berbasis marka molekuler seperti PCR membutuhkan primer enzim spesifik sesuai dengan jenis patogen sasaran. Menurut Bates *et al.* (2001) pengujian kesehatan benih dengan teknik PCR memiliki beberapa keunggulan yaitu sensitif, spesifik, sangat cepat bisa dikerjakan untuk sejumlah besar contoh uji. Glynn dan Edwards (2010) menyatakan bahwa pengujian kesehatan benih

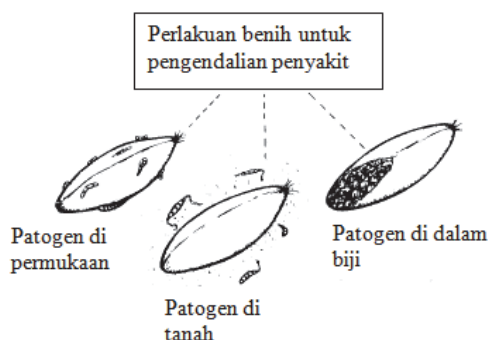
gandum dengan teknik PCR dapat mendeteksi infeksi jamur terbawa benih seperti *Fusarium* dan *Microdochium* dengan persentase serangan sangat rendah 0–5%. Metode ini sangat sesuai untuk deteksi virus dan bakteri yang populasinya pada biji atau jaringan tanaman sangat rendah sehingga sulit terdeteksi menggunakan metode konvensional.

PENGELOLAAN PENYAKIT BENIH

Siklus hidup tanaman aneka kacang dimulai dari tahap perkecambahan benih hingga tahap produksi dan panen biji, selama tahapan tersebut tanaman berinteraksi dengan berbagai jenis mikroorganisme termasuk patogen. Dengan demikian pengendalian penyakit perlu dilakukan sejak tanaman hidup di lapangan (prapanen) hingga panen benih dan selanjutnya disimpan dan didistribusikan (pascapanen). Beberapa komponen pengendalian seperti diuraikan di bawah ini sangat potensial menekan penyakit terbawa benih pada tanaman aneka kacang.

1. Pencegahan Penyakit Prapanen

Pencegahan penyakit prapanen biasanya terintegrasi dalam kegiatan budidaya tanaman, meliputi pemilihan benih sehat, penggunaan varietas tahan penyakit, dan menggunakan teknis budidaya sehat di lokasi non endemik penyakit. Faktor abiotik seperti kelembaban dan suhu tinggi di tanah yang dapat memicu serangan jamur seperti *A. niger* pada kacang tanah, perlu dihindari melalui pemantauan cuaca dan pengaturan waktu tanam. Jamur *A. niger* berkoloni dengan pesat ketika suhu tanah berkisar 22–37 °C (Horn 2005). Kondisi kering pada periode antara berbunga hingga panen pada beberapa jenis kacang seperti kacang *faba*, *chickpea*, dan *lupin* dapat mengurangi serangan jamur pada polong, kondisi ini sangat baik untuk produksi benih sehat (Aftab *et al.* 2008). Penyakit virus SMV pada kedelai, penyebarannya di lapangan dibantu oleh serangga hama *Aphis glycines* yang berperan sebagai vektor. Menurut Saleh (2007)



Gambar 3. Patogen benih pada beberapa posisi sebagai pedoman pengendaliannya melalui perawatan benih.

Sumber: McMullen dan Lamey 2000.

untuk produksi benih aneka kacang bebas penyakit virus salah satu cara yang sangat potensial adalah dengan memilih lokasi tanam di areal terisolir oleh jarak yang sangat jauh dan terhalang dengan tanaman jenis lain yang bukan inang hama vektor ataupun inang virus. Sedangkan pengendalian kimiawi terhadap hama vektor tidak efektif untuk menekan penyakit virus terutama pada jenis virus yang berkembang secara nonpersisten. Pencegahan penyakit prapanen pada dasarnya adalah upaya perlindungan tanaman dengan menerapkan berbagai teknis pengendalian yang efektif.

2. Perawatan Benih Pascapanen

Pencegahan penyakit pascapanen melalui sortasi benih dengan membuang biji retak atau luka dapat membantu menghilangkan munculnya kontaminan pada benih dalam penyimpanan. Kondisi biji yang mengalami kerusakan mekanis yaitu luka atau retak akibat kegiatan panen dan proses pembijian seringkali memudahkan serangan patogen (Agarwal dan Sinclair 1997).

Patogen menempati posisi berbeda pada benih yaitu menempel, masuk dalam biji atau keping biji, dan menembus dalam embrio (Gambar 3). Jamur dan bakteri sebagian besar berada di permukaan dan dalam biji. Sebaliknya virus hanya menginfeksi bagian meristematik benih tepatnya dalam jaringan embrio. Serangan virus SMV pada daun kedelai dapat berkembang secara sistemik hingga mencapai jaringan embrio sehingga viabilitas benih terganggu, akibatnya menurunkan mutu benih.

Patogen dengan berbagai posisi infeksi pada benih tersebut di atas, cara perawatan atau pengendaliannya berbeda pula. Perawatan benih yang sering dilakukan pada saat sebelum tanam atau ketika benih akan disimpan adakah dengan cara mekanis, fisis, dan kimia. Perawatan mekanis bertujuan untuk membuang sumber penyakit yang tercampur dalam lot benih, atau patogen berada di luar benih. Benih perlu dibersihkan secara manual dengan membuang segala jenis cecairan seperti biji berjamur, organ tanaman terinfeksi, tanah, dan serangga. Perawatan mekanis tidak membunuh patogen dalam benih, ataupun menghilangkan patogen yang mungkin menempel di permukaan benih. Oleh karena itu perawatan mekanis seringkali memerlukan perlakuan lebih lanjut misalnya dengan desinfektan. Perawatan fisis pada umumnya dengan menggunakan suhu panas seperti solarisasi yaitu benih dipapar dengan panas sinar matahari (dijemur), direndam dalam air hangat, udara panas, uap panas, dan radiasi mikrowave atau gelombang mikro (Grum *et al.* 1998). Perawatan dengan suhu panas yang aman untuk benih adalah: (1) perendaman

benih dalam air dengan suhu 50–54 °C selama 5–30 menit, (2) uap air suhu 50 °C selama 1 jam, dan (3) pengovenan pada suhu 70 °C selama 3–7 hari (Dhanvantari dan Brown 1993). Jenis komoditas yang berbeda perlu suhu dan lama perlakuan yang berbeda pula. Benih kacang ercis *Pisum sativum* yang direndam dalam air dengan suhu 52 °C selama 12–13 menit, dapat menurunkan infeksi kompleks jamur terbawa benih hingga 55,2% (Begum *et al.* 2004). Benih kacang buncis *Phaseolus vulgaris* yang terserang bakteri *Xanthomonas campestris* dapat direndam selama 20 min pada suhu 52 °C, sedangkan benih kacang ercis yang terserang bakteri *Pseudomonas syringae* perlu perendaman selama 15 min pada suhu 55–60 °C (Flyod 2005). Perawatan dengan suhu panas sangat sesuai untuk sistem pertanian organik sebagai alternatif pengendalian non kimiawi (Tinivella *et al.* 2005).

Perawatan secara kimia menggunakan pestisida (fungisida, antibiotik, insektisida) dan desinfektan, pada umumnya diterapkan dalam industri benih. Desinfektan hanya berperan sebagai protektan untuk menghilangkan kontaminan tercampur atau menempel di permukaan benih. Larutan desinfektan NaOCl 1% untuk pencucian benih kacang ercis, dapat menurunkan hingga 57,5% serangan kompleks jamur terbawa benih seperti *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, dan *Rhizopus* (Begum *et al.* 2004). Fungisida mankozeb yang aktif sebagai racun kontak merupakan fungisida yang sering digunakan untuk penyelaupan benih tanaman pangan seperti jagung, kacang tanah, kedelai, dan sereal lain (Yellow River 2010). Beberapa jenis fungisida seperti metalaksil, azoksistrobin dan fludioksonil merupakan fungisida standar untuk perawatan benih oleh kalangan industri benih (Gillard dan Ranatunga 2013). Demikian juga fungisida kaptan dan tiram sering diaplikasikan melalui benih untuk menekan jamur terbawa benih juga jamur tular tanah penyebab penyakit *damping-off*. Tiram dilaporkan efektif untuk menekan penyakit pra dan pasca kecambah pada kedelai yang disebabkan berbagai jamur seperti *Aspergillus* spp., *F. moniliforme*, *Curvularia lunata* dan *Penicillium* spp. (Solanke *et al.* 1997). Untuk perawatan benih kedelai, karboksil dicampur dengan tiram masing-masing dengan dosis 2 g/kg benih, dapat meningkatkan perkecambahan yang mencapai 83% dibandingkan tanpa perlakuan perkecambahan hanya 74% (Zorato dan Henningh 2001). Kaptan dengan dosis 2,5 g/kg benih dan 2,5 g tiram/1 kg benih, dilaporkan efektif menekan serangan kompleks jamur terbawa benih kedelai seperti *Diaporthe* sp., *Alternaria alternate*, *A. flavus*, *C. lunata* and *F. oxysporum* serta meningkatkan daya kecambah, panjang kecambah dan bobot kering kecambah (Manshi *et al.* 2004). Informasi terbaru me-

nyebutkan bahwa fungisida dengan merek dagang Tiflo dengan kandungan tiram 80%, direkomendasikan untuk perawatan benih di Indonesia (Roup 2016).

Perawatan benih menggunakan ekstrak tanaman dan agens pengendali hayati (APH) sangat potensial untuk mengendalikan penyakit benih. Tanaman mimba *Azadirachta indica* mengandung senyawa azadirachtin yang berkhasiat sebagai pertisida organik. Perawatan benih kacang tanah menggunakan ekstrak mimba efektif untuk menekan serangan beberapa jamur seperti *A. niger*, *A. flavus*, dan *Rhizopus* (Hassan *et al.* 2015). Demikian juga dengan daun jarak *Datura stramonium*, ekstrak daun dalam pelarut air untuk perawatan benih kacang tunggak, dilaporkan mampu meningkatkan perkecambahan benih hingga 90,7% dan serangan jamur penyebab busuk kecambah turun menjadi 8,0% dibandingkan kontrol tanpa ekstrak *Datura* serangan jamur mencapai 61,3% (Baka *et al.* 2014).

Agens pengendali hayati (APH) terdiri beberapa jenis jamur dan bakteri antagonis dilaporkan cukup baik dapat mengendalikan penyakit terbawa benih. Bakteri APH sering digunakan untuk perawatan benih terutama dari jenis *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, dan *Bacillus*; sedangkan jamur APH yang utama adalah *Trichoderma* dan *Gliocladium* (Callan *et al.* 1997). *Bacillus megaterium* cukup efektif untuk menurunkan serangan jamur terbawa benih kedelai dan meningkatkan pertumbuhan benih (Sonavane *et al.* 2011). Menurut Ram dan Bhanushally (2003) perawatan benih kacang tanah menggunakan jamur antagonis *Trichoderma harzianum* dengan dosis 10g/kg benih, efektif untuk menekan serangan *Aspergillus* sp. Sethuraman *et al.* (2003) meneliti penggunaan *T. viride* (4 g/kg benih) dan bakteri APH *P. fluorescens* (10 g/kg benih) dengan cara penyelaupan benih kacang hijau sebelum ditanam dan disimpulkan bahwa perlakuan tersebut dapat menekan busuk perakaran oleh jamur *M. phaseolina* hingga dicapai serangan 4,16% dan 4,59% untuk masing-masing APH, sedangkan pada kontrol tanpa APH penyakit mencapai 14,04%.

PENUTUP

Penyakit terbawa benih disebabkan terutama oleh patogen dari jenis jamur, bakteri dan virus yang beraal dari lapangan. Penyakit dapat menyebar dan menular ke areal yang luas mengikuti alur distribusi benih skala nasional bahkan internasional, hal ini menjadi kendala dalam perdagangan benih bermutu yang dicirikan antara lain dengan terbebasnya benih dari penyakit penting. Status kesehatan benih dapat diketahui dengan deteksi penyakit melalui pengujian kesehatan benih yang sesuai dengan prosedur standar dari ISTA atau *International Seed Testing Association* suatu

lembaga dunia yang secara resmi menetapkan standar mutu benih, dan uji kesehatan benih. Uji kesehatan benih berperan penting dalam perbaikan mutu benih (*seed improvement*), perdagangan benih (*seed trade*), dan perlindungan tanaman (*plant protection*). Teknis pengujian sangat tergantung pada jenis benih, jenis patogen yang dideteksi dan tujuan pengujian, yang dilakukan dengan metode sederhana ataupun dengan metode molekuler. Pengujian kesehatan benih sebaiknya dilakukan oleh laboratorium terakreditasi yang dikelola secara profesional. Kesehatan benih atau mutu patologis benih aneka kacang pada umumnya belum diperhatikan serius oleh petani, sementara itu kebutuhan benih seringkali diproduksi secara mandiri. Untuk mencegah timbulnya masalah rendahnya daya kecambah, vigor, kerusakan tanaman akibat dari penyakit benih maka perlu dilakukan pengawalan teknologi dari pihak berwenang. Secara teknis, telah diketahui banyak hasil penelitian pengendalian penyakit terbawa benih yang efektif meliputi pengendalian prapanen dan pengendalian pascapanen termasuk perawatan benih selama dalam penyimpanan atau selama distribusi benih.

DAFTAR PUSTAKA

- Aftab M, A Freeman, and TB Horsham. 2008. Seed health testing in pulse crops. Agriculture Note, Depart. of Primary Industries, State of Victoria. 4 pp.
- Agarwal V.K. and Sinclair, J.B. 1997. Principles of Seed Pathology 2nd. Boca Raton: CRC. 538 p.
- Andayanie W.R. 2012. Diagnosis penyakit mosaik (*Soybean Mosaic Virus*) terbawa benih kedelai. J. Tropika 12(2):185–191.
- Baka Z.A., M.S. Serag, T.A. Kardosha. 2014. Evaluation of some plant extracts for controlling mycoflora causing spoilage of stored cereals and legumes. Scientific J. for Damietta Fac. of Sci. 3 (1):53–61.
- Bakr M.A. and Rahman M.L. 998. Current status of research on mungbean and blackgram diseases and future needs. Proceeding of the workshop on diseases resistance breeding in pulse. Bangladesh J. Agric. Res. 11, 64.
- Balai Besar Pengembangan Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura (BBPPMBTPH). 2007. Deteksi bakteri patogen benih. Dirjen Tanaman Pangan. Jakarta. 122 hlm.
- Barros G.G., Oviedo, M.S., Ramirez, M.L. and Chulze, S.N. 2011. Safety aspect in soybean food and feed chains: fungal and mycotoxins contamination. In Soybean-Biochemistry, Chemistry and Physiology (Tzi-Bu Ng. ed), InTech.
- Bates, J.A. and Taylor, E.J.A. (2001) Scorpion ARMS primers for SNP real-time PCR detection and quantification of *Pyrenophora teres*. Mol Plant Pathol 5, p:275–280.
- Begum A.A.J, P. Balamurugan, K. Vanangamudi, and K. Prabakar. 2013. Establishing seed standard for seed health test in groundnut *Arachis hypogaea* L. for *Aspergillus flavus*. African J. of Agric. Res. 8(38):4839–4848.
- Begum N., K.Z. Alfi, M.I. Haque, M.U. Raja, and S. Chohan. 2004. Evaluation of mycoflora associated with pea seeds and some control measures. Plant Pathol. J. 3(1):48–51.
- Callan N.W., Mathre D.E., Miller J.B., Vavrina C.S. 1997. Biological seed treatments: factors involved in efficiency. Hort. Sci. vol 32 p.179–183.
- Dhanvantari BN, Brown RJ, 1993. Improved seed treatments for the control of bacterial canker of tomato. Canadian J. of Plant Pathol. 15, 201–5.
- Dharmaputra O.S., dan I. Retnowati. 1996. Fungi isolated from groundnuts in some locations of West Java. Biotropika No. 9: 15–25.
- Diaz C., M. Hossain, M.L. Bose, S. Mercea and T.W. Mew. 1998. Seed quality and effect on rice yield: findings from farmers participatory experiment in Central Luzon, Philippines. J Crop Sci. 23:111–119.
- Dutta B., R. Gitainis, S. Smith, and D. Langston Jr. 2014. Interactions of seedborne bacterial pathogens with host and non-host plants in relation to seed infestation and seedling transmission. PLOS ONE. Vol. 9, Issue 6, e99215. 13 pp. www.plosone.org.
- Elwakil M.A. and El-Metwally M.A. 2001. Seed-borne fungi of peanut in Egypt: pathogenicity and transmission. Pakistan J. of Biol. Sci, 4(1):63–68.
- Floyd, R. 2005. Vegetable seed treatments, Farm note 90/1990. Department of Agriculture and Food, Western Australia. http://archive.agric.wa.gov.au/PC_92733.html.
- Giesler J.L. 2011. Symptoms, epidemiology, identification and management of Nebraska's two most prominent bacterial diseases in soybean –bacterial blight and bacterial pustule. [www/elkhorn.unl.edu/e-public/live/g1544/build/#bdm](http://www.elkhorn.unl.edu/e-public/live/g1544/build/#bdm)
- Gillard C.L. and Ranatunga N.K. 2013. Interaction between seed treatments, surfactants and foliar fungicides on controlling dry bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). Crop Prot.45:22–28.
- Glynn N.C. and S.G. Edwards. 2010. Evaluation of PCR assays for quantifying seed-borne infection by *Fusarium* and *Microdochium* seedling blight pathogens. J. of Appl. Microbiol. 108: 81–87.
- Grum M., Camloh M., Rudolph K., and Ravnika M. 1998. Elimination of bean seed-borne bacteria by thermotherapy and meristem culture. Plant Cell, Tiss. Organ Cult. 52(1):79–82.
- Hassan D., M.N. Galti, and B. Ali. 2015. Use of Neem (*Azadirachta indica*) seed powder to treat ground-

- nut seed-borne pathogenic fungi. *Euro J. Exp. Bio.* 5(5):69–73.
- Horn B.W. 2005. Colonization of wounded peanut seeds by soil fungi: selectivity for species from *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycologia*, 97(1):202–217.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2006. International Rules for Seed Testing. Bassedorf, Switzerland.
- Jackson E.W., Fenn P., and Chen P. 2005. Inheritance of resistance to *Phomopsis* seed decay in soybean PI 80837 and MO/PSD-0259 (PI 562694). *Crop Sci.* 45:2400–2404.
- Kakde R.B. and Chavan A.M. 2011. Deteriorative Changes in Oilseed due to Storage Fungi and Efficacy of Botnicals. *Current Bot.* vol 2, p.17–22.
- Malvick, D. 2002. Soybean Seed Treatments and Control of Seed and Seedling Diseases. <http://bulletin.ipm.illinois.edu/pastpest/articles/200202i.html>.
- Manshi G.D., R. Mandeep, and R.C. Sharma. 2004. Effect of fungicidal seed treatments on *Phomopsis* and other seed mycoflora of soybean. *J. Res.* 41: 352–355.
- McGee, D.C. 1995. Epidemiological approach to disease management through seed technology. *Ann. Rev. Phytopathol.* 33(1):445–466.
- McGee and Nyval. 2008. [www//estensio.net/agron.iastate.edu](http://www.estensio.net/agron.iastate.edu). p:11–15.
- McMahon, K. 2011. Corn, soybeans at risk for seedling disease. <http://farmindustrynews.com/seed-treatment/corn-soybean-risk-seedling-disease>.
- McMullen, M.P., and H.A. Lamey 2000. Seed Treatment for Disease Control. <http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/crops/pp447w.html>.
- Mehan, V.K., C.D. Mayee, T.B. Brennenman, and D. McDonald. 1995. Stem and pod rots of groundnut. Information bulletin no. 14, ICRISAT, Andhra Pradesh, India. 23 pp.
- Mengistu, A., Arelli P.A., Bellaloui N., Bond J.P., Shannon G.J., Wrather A.J., Rupe J.C., Chen P., Little C.R., Canaday C.H., Newman M.A., and Pantalone V.R. 2012. Evaluation of soybean genotypes for resistance to three seed-borne diseases. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2012-0321-02-RS.
- Murashiki, H.H. 2002. Purple Seed Stain of Soybean. *Phytopathol* vol 41:305–318.
- Naiko, A, Wani M., Nazir A.B., Waheed U.Z., Suliman D. and Mohammood A.T. 2013. Effect of Seed-Borne Mycoflora on the Quality of three Varieties of *Arachis hypogea*. *Internat. J. of Agric. Sci. and Res.* 3(1): p.35–42.
- Pathan M.S., Clark, K., Wrather J.A., Sciumbato G.L. Shannon J.G., Nguyen H.T., and Sleper D.A. 2009. Registration of soybean germplasm SS93-6012 and SS93-6181 resistant to *Phomopsis* seed decay. *J. Plant Regist.* 3:91–93.
- Rahayu, M. 1989. Pengaruh serangan soybean mosaic virus (SMV) terhadap hasil dan mutu benih kedelai. Thesis S2 Fakultas Pasca Sarjana, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. 50 hlm.
- Ram, D., and Bhanushally T.V. 2003. Integrated management of collar rot of groundnut. *J. Mycology Pl. Path.* 33(3):481pp.
- Ramesh BV, Hiremath SV, Naik MK, Amaresh YS, Lokesh BK and Vasudevan SN. 2013. Study of seed mycoflora of soybean from north eastern Karnataka *J. Agri. Sci.* 26 (1): 58–62.
- Rao T.V., B. Rajeswari, K. Keshavulu and V. Sandeep Varma. 2015. Studies on seedborne fungi of soybean. *SSRG Internat. J. of Agric. & Environ. Sci.* (SSRG-IJAES), Vol 2, Issue1, pp:16–24.
- Roup. 2016. Fungisida TIFLO untuk perlakuan benih (seed treatment). www.nutani.com/fungisida-tiflo-untuk-perlakuan-benih-seed-treatment.html. Diakses : 25 Januari 2017.
- Saleh, N. dan Y. Baliadi. 2015. Penyakit virus pada kacang tanah dan upaya pengendaliannya. Monograf Balitkabi No. 13. Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi, Malang. hlm . 306–328.
- Saleh N. 2007. Sistem produksi kacang-kacangan untuk menghasilkan benih bebas virus. *Jurnal IPTEK Tanaman Pangan* 2(1):66–78.
- Sethuraman K., Revathy N., and Manivannan M. 2003. Efficacy of biocontrol microorganisms on root rot of blackgram caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Legume Research.* 26 (3): 218–220.
- Shingare P., and Ade A. 2014. Deterioration of protein in the diseased groundnut kernels due to infection of fungi. *National conference on Plant Pathology*, 2–3 March 2014, R. Shahu College, Latur, India.
- Singh S., Srivastava S., Shikha S.A., and Bose B. 2011. Studies on seed mycoflora of wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with potassium nitrate and its effect on germination during storage. *Research Journal of Seed Science*, vol 4:148–156.
- Solanke R.B., S.S. Kore and S.M. Sudewad, 1997. Detection of soybean seed-borne pathogens and effect of fungicides. *J. Maharashtra Agric. Univ.* 22: 168–170.
- Sonavane A.A., B.G. Barhate and S.J. Bade, 2011. Efficacy of bioagents and fungicides on seed mycoflora of soybean. *J. Plant Dis. Sci.* 6: 74–76.
- Sunartiningsih, W. Wakman, A. Hasanuddin dan S. Saenong. 1991. Penurunan hasil kedelai akibat penyakit mosaik yang ditularkan *Aphis glycines*. *Agrikam* 6(3):89–94.
- Sutopo L. 2004. Teknologi Benih. PT Rajawali Press, Jakarta. 161 hlm.

- Sweets L. 2009. Soybean seed: to treat or not to treat. <http://cornandsoybeandigest.com/soybean-seed-treat-or-not-treat>.
- Sweets L.E., A. Wrather, and S. Wright. 2008. Integrated pest management: Soybean diseases. Plant protection programs, College of agriculture food and natural resources. Univ. of Missouri. Colombia. 28 pp.
- Tinivella F., Gullino M.L. and Garibaldi A. 2005. Organic seed: rules and new techniques of seed dressing to control plant pathogens. *Informatore Fitopatologico* 55.
- Toussaint V., C.E. Morris, and O. Carisse. 2001. A new semi selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*, the causal agent of bacterial leaf spot of lettuce. *Plant Dis.* 85:131–136.
- Villarroel D.A., Baird R.E., Trevathan L.E., Watson C.E. and Scruggs M.L. 2004. Pod and seed mycoflora on transgenics and conventional soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars in Mississippi. *Mycophatol.* vol 157: p.207–215.
- Vishunavat, K. 2009. Fundamentals in Seed Pathology. Kalyani Publ Ludiana. New Delhi, India. 260 pp.
- Wang, H. and Davis R.M. 1997. Susceptibility of selected cotton cultivars to seedling disease pathogens and benefits of chemical seed treatments. *Plant Dis.* vol 81, p.1085–1088.
- Wydra K., Khatri-Chetri G., Mavridis A., Sikiron R., and Rudolph K. 2004. A diagnostic medium for the semi-selective isolation and enumeration of *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola*. *J. Plant Pathol.* 110:991–1001.
- Yellow River Enterprise Co. Ltd. 2010. Mancozeb. <http://www.yelori.com/products/Mancozeb.shtml>. Diakses 15 Maret 2010.
- Zeng, D.F., Tan., Yj., and Xu, Z.Y. 1994. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in peanut seeds. *Bacterial Wilt Newsletter* No. 10, pp: 8–9.
- Zhang J., Howell C.R., and Starr J.L. 1996. Suppression of fusarium colonization of cotton roots and fusarium wilt by seed treatments with *Gliocladium virens* and *Bacillus subtilis*. *Biocontrol Sci. Tech.* vol 6, p.175–187.
- Zorato M.F and Henningh A.A. 2001, Effect of fungicide seed treatment applied at different storage times on soybean seed quality. *Revist-Brasileira de senate* 23(2): 236–244.